

DE L'INFLUENCE
EXERCÉE SUR
LE BACILLUS ANTHRACIS

par certaines variations simples dans le mode de culture

— PARTICULIÈREMENT DE LA CULTURE EN MILIEU PAUVRE —

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 15 Janvier 1894

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

HENRI PARIS

Né le 4 Juin 1874, à Breigny (Côte-d'Or)

ÉLÈVE A L'ÉCOLE DU SERVICE DE SANTÉ MILITAIRE



LYON

ALEXANDRE REY, IMPRIMEUR DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

4, RUE GENTIL, 4

—
Janvier 1894

DE L'INFLUENCE
EXERCÉE SUR
LE BACILLUS ANTHRACIS

par certaines variations simples dans le mode de culture

— PARTICULIÈREMENT DE LA CULTURE EN MILIEU PAUVRE —

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 15 Janvier 1894

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

HENRI PARIS

Né le 4 Juin 1871, à Bretigny (Côte-d'Or)

ÉLÈVE A L'ÉCOLE DU SERVICE DE SANTÉ MILITAIRE



LYON

ALEXANDRE REY, IMPRIMEUR DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

4, RUE GENTIL, 4

—
Janvier 1894

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

MM. LORTET. DOYEN
GAYET. ASSESSEUR.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. DESGRANGES, PAULET, BOUCHACOURT, CHAUVEAU, GLÉNARD.

PROFESSEURS

Cliniques médicales	{ MM. LÉPINE.
Cliniques chirurgicales.	{ BONDET.
Clinique obstétricale et Accouchements.	{ OLLIER.
Clinique ophtalmologique.	{ PONCET.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.	{ FOCHIER.
Clinique des maladies mentales	{ GAYET.
Physique médicale	{ GAILLETON.
Chimie médicale et pharmaceutique.	{ PIERRET.
Chimie organique et Toxicologie.	{ MONOYER.
Matière médicale et Botanique.	{ HUGOUNENQ.
Zoologie et Anatomie comparée.	{ CAZENEUVE.
Anatomie.	{ FLORENCE.
Anatomie générale et Histologie.	{ LORTET.
Physiologie.	{ TESTUT.
Pathologie interne.	{ RENAUT.
Pathologie externe.	{ MORAT.
Pathologie et Thérapeutique générales	{ TEISSIER.
Anatomie pathologique.	{ BERNE.
Médecine opératoire.	{ MAYET.
Médecine expérimentale et comparée	{ TRIPIER.
Médecine légale.	{ POLLOSSON (MAURICE)
Hygiène	{ ARLOING.
Thérapeutique	{ LACASSAGNE.
Pharmacie.	{ ROLLET.
	{ SOULIER.
	{ CROLAS.

PROFESSEUR ADJOINT

Clinique des Maladies des Femmes.	LAROYENNE.
---	------------

CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES

Clinique des Maladies des Enfants	MM. WEILL, agrégé.
Accouchements.	POLLOSSON (Aug.) —
Botanique.	BEAUVISAGE. —

AGRÉGÉS

MM. AUGAGNEUR.	MM. DIDELOT.	MM. ROCHET.	MM. WEILL.
BEAUVISAGE.	GANGOLPHE.	RODET.	BOUVEAULT,
CONDAMIN.	JABOULAY.	ROLLET (ÉTIENNE)	chargé des fonctions d'agrégé.
COURMONT.	LANNOIS.	ROQUE.	BARRAL,
DEROIDE.	PERRET.	ROUX.	chargé des fonctions d'agrégé.
DEVIC.	POLLOSSON (Aug.)	VIALLETON.	

M. ETIÉVANT, Secrétaire.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. ARLOING, Président; M. HUGOUNENQ, Assesseur; MM. RODET et COURMONT, Agrégés.

La Faculté de médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les Dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

A MON PÈRE

A MA MÈRE

A MON FRÈRE

A MES PARENTS

A MES AMIS

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

M. LE PROFESSEUR ARLOING

A M. LE PROFESSEUR-AGRÉGÉ RODET

A MES MAÎTRES ET A MES CHEFS

AVANT-PROPOS

Ayant toujours aimé vivement les sciences d'expérimentation, dès le début de nos études médicales, nous nous sentions attiré vers les parties vraiment scientifiques de la médecine; et, lorsqu'il s'agit de choisir notre sujet de thèse inaugurale, nous nous sommes dirigé tout naturellement du côté du Laboratoire de médecine expérimentale : celui de Lyon se distingue par la hauteur et la clarté de l'enseignement des maîtres qui le dirigent, il se distingue également par les ressources de tous genres qui s'y trouvent réunies; aussi, sommes-nous heureux et fier de l'avoir fréquenté assidûment pendant une année; nous en garderons toujours un excellent souvenir.

C'est avec un sentiment de respect et même de timidité que nous avons inscrit au commencement de ce travail, le nom de M. le professeur Arloing, ce juge si autorisé aujourd'hui dans les questions de microbiologie; nous

sommes profondément touché de l'honneur qu'il nous fait en acceptant la présidence de notre thèse.

M. le professeur agrégé Rodet nous a inspiré ce sujet, il nous a initié avec patience à la technique si délicate de la bactériologie, aux moments de découragement, comme un ami il nous est venu en aide et nous a redonné confiance en nous-même : notre reconnaissance lui est assurée pour toujours.

M. le professeur agrégé Lannois, nous a donné de bons conseils à maintes reprises et avec beaucoup d'aimabilité, il nous a facilité l'entrée au Laboratoire de médecine expérimentale, nous le remercions sincèrement.

Nous nous rappellerons constamment, durant notre carrière médicale, et avec autant de profit que de plaisir, les excellentes leçons cliniques et théoriques de nos Maîtres de la Faculté et de l'École.

Notre grand ami et camarade Cathoire ayant mis gracieusement à notre disposition ses talents d'artiste dessinateur, nous les avons acceptés; aussi notre sympathie pour lui augmentera s'il est possible.

INTRODUCTION

On s'est surtout attaché de nos jours à étudier l'action de certains agents extérieurs sur les microbes pathogènes : pression, chaleur, lumière, électricité, dans l'ordre des agents physiques ; antiseptiques, gaz, toxines, dans l'ordre des agents chimiques ; mais il semble que l'on a tenu peu de compte de l'influence que pouvaient avoir, sur ces microbes pathogènes, des variations banales du milieu nutritif, telles qu'abondance plus ou moins grande, richesse ou pauvreté alimentaire, renouvellement.

Nous allons voir cependant par un rapide aperçu des faits déjà acquis, qu'il n'est pas sans intérêt d'être fixé exactement sur les effets de ces variations, qui peuvent se trouver réalisées à chaque instant dans les laboratoires.

Les premières observations relatives à la question ont été faites au laboratoire de médecine expérimentale de Lyon par M. Chauveau : il avait remarqué nettement que, pour conserver la virulence à une culture de *bacillus*

anthracis très virulent, il ne faut pas se servir d'un milieu trop riche en matériaux nutritifs (dans ce but il se servait d'un bouillon contenant 1 partie de viande pour 4 d'eau) ; il faut également que ce milieu ne soit pas trop abondant, et enfin qu'il soit en couche mince.

Ces conditions doivent absolument être réunies, quand on veut conserver sa virulence à une culture de *bacillus anthracis* atténué, sans quoi l'on s'expose à voir s'exagérer encore davantage cette atténuation.

M. Chauveau a insisté à différentes reprises sur ces faits et il les a mis parfaitement en lumière dans plusieurs notes à l'Institut ; seulement ce qu'il a visé plus particulièrement, ce sont les propriétés physiologiques, infectieuses, ou mieux l'activité physiologique des microorganismes pathogènes, pour employer ses propres expressions, dans ses rapports avec le milieu nutritif ; les propriétés végétatives, c'est-à-dire le point de vue purement botanique, avaient été laissées dans l'ombre : or, de ce côté M. Rodet, au même laboratoire, avait observé un phénomène remarquable : dans plusieurs expériences il avait constaté qu'une certaine pauvreté du milieu nutritif en aliments, et une petite quantité de ce milieu étaient éminemment favorables à la formation rapide de très nombreuses spores et que les conditions inverses étaient au contraire complètement défavorables.

M. Rodet, frappé de ces résultats et les rapprochant de ceux concernant la virulence, qu'avait indiqués M. Chauveau, ayant constaté lui-même plusieurs fois une atténuation, sous l'influence de la richesse nutritive du milieu, se demanda s'il n'y avait pas une relation étroite entre les propriétés végétatives, en particulier la propriété sporo-

gène ou aptitude à produire des spores et la virulence ; il entreprit alors des expériences pour rechercher s'il y avait des variations simultanées de l'une et de l'autre en rapport avec la richesse et l'abondance du bouillon de culture.

C'est à ce moment que M. Chauveau publia son mémoire « *sur les propriétés vaccinales des microbes ci-devant pathogènes transformés en microbes que la culture destitua de toutes propriétés virulentes*¹ » ; il s'était attaché à « la restitution de la virulence aux races de bacilles, qui en avaient été complètement privées ».

Entre autres méthodes, il avait recherché l'influence de la culture en milieu pauvre, qui d'ailleurs n'avait pas réussi à donner un résultat bien net au point de vue de la virulence ; il signalait incidemment l'observation de M. Rodet touchant les variations de la fonction sporogène ; à la quatrième génération de culture en bouillon pauvre il n'avait obtenu aucune restitution de la virulence : nous verrons dans le courant de ce travail comment on pourrait peut-être interpréter ce résultat en contradiction avec la relation ou loi soupçonnée dont nous parlions plus haut.

Tel était l'état de la question quand M. Rodet nous engagea à la reprendre en détail. L'étude des variations des propriétés morphologiques et pathogènes, évidemment très importante au point de vue de la biologie et de l'histoire naturelle, ne l'est pas moins au point de vue de la pathologie générale, qui intéresse plus spécialement le médecin ; en effet, il existe une doctrine pour laquelle, la propriété pathogène n'appartient pas en propre au

¹ *Archives de médecine expérimentale*, 1889.

microbe lui-même, mais n'est qu'une propriété d'emprunt, que le passage dans l'organisme animal est seul capable de communiquer; dans la doctrine de la spécificité pathogène, au contraire, cette propriété est intrinsèque, et s'il en est ainsi, il y a bien des chances de voir se modifier parallèlement d'une part la virulence, et d'autre part les propriétés proprement botaniques, notamment la propriété sporogène.

A cette question de la spécificité, se rattache celle de savoir quel est, pour un microbe donné, le milieu le plus favorable et pour ainsi dire naturel; est-ce un milieu vivant ou un milieu artificiel: savoir, en un mot si on a affaire à un microbe parasite ou à un microbe saprophyte.

Autant de problèmes qui pourront trouver des faits pour ou contre dans ce travail.

L'étude que nous avons entreprise, pour être complète, aurait dû comprendre l'influence, d'un côté sur les caractères végétatifs et la sporulation, et, d'un autre côté, sur la virulence, des conditions suivantes :

1° Richesse ou pauvreté du milieu en matériaux nutritifs;

2° Abondance du milieu (grandes et petites cultures);

3° Renouvellement du milieu, qui peut être intermittent ou continu.

Ç'aurait été le plan de notre exposé, mais nous nous sommes surtout attaché au premier point, les deux derniers n'ayant pas été traités longuement, nous ne pouvons en faire l'objet de chapitres distincts.

Notre division sera donc la suivante :

La première partie s'occupera des caractères mor-

phologiques, dans les différentes conditions énumérées plus haut ; ce sera la partie purement botanique.

La seconde concernera la virulence, moins étendue que la première, nous n'y avons guère rapporté que des résultats connus ; il eût cependant été intéressant de reprendre la question où l'avait laissée M. Chauveau, mais le temps nous a manqué.

En somme, voici le plan que nous avons adopté :

PREMIÈRE PARTIE. — Influence sur les propriétés botaniques du *bacillus anthracis* :

Milieu riche en matériaux nutritifs

Chapitre premier :

De la richesse du milieu.
De l'abondance du milieu.
Du renouvellement du milieu.

Milieu pauvre en matériaux nutritifs.

Chapitre II :

De la pauvreté du milieu.
De la pauvreté croissante du milieu.
De la répétition du milieu.

DEUXIÈME PARTIE. — Influence de ces diverses conditions sur la virulence.

TROISIÈME PARTIE. — Conclusions.

Si nous avons traité dans un chapitre spécial l'influence de la pauvreté du milieu nutritif, c'est qu'ayant accumulé

à ce sujet un assez grand nombre de faits, il y aurait eu disproportion avec les autres divisions bien moins longues de la première partie.

Nous rapprocherons souvent dans le cours de ce travail, pour les comparer, le *bacillus anthracis* virulent et le *bacillus anthracis* atténué.

DE L'INFLUENCE
EXERCÉE SUR
LE BACILLUS ANTHRACIS
par certaines variations simples dans le mode de culture
— PARTICULIÈREMENT DE LA CULTURE EN MILIEU PAUVRE —

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

Bouillon riche en matériaux nutritifs.

Considérations générales.

Il importe tout d'abord d'être bien fixé sur ce que l'on entend par bouillon riche; pour cela, le meilleur moyen est d'en connaître la composition; or, celle-ci nous est donnée par le mode de préparation lui-même : nous le rappellerons donc brièvement :

D'habitude on fait macérer 1 kilogramme de viande de bœuf dégraissée dans 2 litres d'eau pendant vingt-quatre heures, on porte ensuite le tout à l'ébullition pendant deux ou trois heures, on filtre soigneusement, enfin, le filtrat

est étendu d'eau, de façon à le ramener au volume primitif; on peut aussi, comme au laboratoire de médecine expérimentale de Lyon, supprimer l'infusion à froid et opérer d'emblée par l'ébullition, les proportions d'eau et de viande étant d'ailleurs les mêmes.

Par conséquent, le bouillon employé ordinairement, le bouillon type, si nous pouvons nous exprimer ainsi, est formé d'une partie de viande pour deux parties d'eau; nous sommes en droit d'appeler ce bouillon ordinaire : bouillon riche.

Avant de décrire l'influence des conditions que nous devons envisager successivement, esquissons rapidement les caractères d'une végétation normale de *bacillus anthracis* virulent. Au bout de trois ou quatre jours de culture dans un milieu ordinaire, c'est-à-dire riche, une grande quantité de bactériidies sont transformées en assez longs filaments bien colorés, de diamètre régulier, plus ou moins segmentés; ils sont tantôt isolés, tantôt, et le plus souvent, accolés ou enroulés les uns autour des autres; on rencontre un certain nombre de bactériidies seules, avec leur longueur et leur épaisseur ordinaires; les spores sont peu abondantes, assez bien formées, dilatant plus ou moins les articles qui les contiennent. Si l'examen est pratiqué après cinq ou six jours de culture, on voit que les filaments sont moins fragmentés, et que les spores, pas plus nombreuses, sont cependant plus réfringentes et complètement achevées.

Influence de la richesse du bouillon.

Plusieurs fois M. Rodet a observé un fait inexplicable, sur lequel il a attiré notre attention : brusquement sans cause appréciable, dans des cultures en bouillon riche, apparaissent des formes anormales de bactériidies fort analogues aux formes dites d'involution, et qu'on peut appeler monstrueuses : il y a une grande variété dans ces formes, tantôt ce sont des éléments arrondis sur une partie ou sur toute leur longueur, tantôt ils représentent des figures de poires, de raquettes, de sabliers, etc., les uns sont très vivement colorés par les matières colorantes, les autres le sont moins ; tous les bacilles ne sont pas ainsi modifiés, il est même remarquable de voir qu'à côté d'un filament composé d'éléments anormaux, il y a des filaments entièrement composés d'éléments tout à fait normaux ; il n'y a généralement pas de spores dans les bâtonnets altérés, il y en a également peu dans l'ensemble de la préparation. Les formes monstrueuses peuvent se montrer dans le cours d'une série de cultures renouvelées régulièrement et fréquemment ; M. Rodet les a notées 11, 8, 6 et même 4 jours après ensemencement, il est donc impossible d'invoquer le vieillissement comme pour les véritables formes d'involution, qui du reste n'apparaissent pas fatalement dans les vieilles cultures ; nous avons eu en effet plusieurs examens négatifs ; l'épuisement de la bactériidie par des cultures répétées en milieu artificiel n'est pas plus admissible, car nous possédons un cas où les formes anormales ont paru peu de jours

après l'ensemencement d'un bouillon riche, par quelques gouttes de sang charbonneux. Cette déviation de la morphologie offre une particularité intéressante : celle de se transmettre héréditairement dans des cultures successives et cela indéfiniment pour ainsi dire, à moins d'une qualité particulièrement favorable du bouillon qui peut la faire progressivement disparaître : nous verrons par exemple plus loin l'influence qu'exercent sur elle les milieux pauvres ; M. Rodet, ayant pensé que la peptone en était peut-être la cause, a fait des expériences comparatives, d'où il résulte que la présence ou l'absence de cette substance n'a pas d'action marquée.

Jusqu'à plus ample informé, on ne peut attribuer la production des formes monstrueuses qu'à la richesse du milieu nutritif, jamais on ne les a observées dans d'autres circonstances. Peut-être faut-il accuser une certaine qualité indéterminée de la viande qui a servi à préparer le bouillon ? car avec des bouillons riches en apparence identiques, étant donné le mode de préparation, toujours le même, nous observons dans tous les cas la pauvreté en spores, non les anomalies de la végétation que nous venons d'énumérer. Peut-être faut-il accuser le vieillissement du bouillon avant son ensemencement ? Ce n'est là qu'une hypothèse.

Il nous est arrivé personnellement, à la suite d'un ensemencement de sang charbonneux en bouillon riche, d'obtenir après trois jours, une culture à caractères spéciaux attribuables peut-être à la richesse du bouillon ; les voici (fig. 3) : les bactériidies sont la plupart isolées, de mêmes dimensions que celles du sang ; il n'y a presque pas de filaments, ceux que l'on trouve sont très nettement

divisés en bâtonnets courts et étroits au nombre de quatre ou cinq au plus; la végétation est pauvre; enfin on ne distingue pas de spores bien formées, il n'y a que de rares spores commençantes. Il semble que la culture se ressente profondément du passage de la semence dans l'organisme animal : en effet ce qui caractérise le développement de la bactériodie dans le sang c'est l'absence absolue de spores, de filaments longs et de filaments non segmentés; le bouillon ressemble de très loin il est vrai au sang, mais pour la richesse en matériaux nutritifs ils sont un peu comparables; or dans ce dernier milieu la bactériodie ne trouve pas des conditions essentiellement propres à son développement purement végétal.

Influence de l'abondance et de la hauteur du bouillon.

M. Rodet a démontré d'une façon indiscutable que la quantité du bouillon n'était pas indifférente, pour les résultats de la culture; un ensemencement ordinaire dans une grande quantité de bouillon est, *a priori*, assimilable à un ensemencement très faible dans une quantité ordinaire de bouillon; si nous disons cela, c'est pour montrer comment on a été amené à étudier l'influence de l'abondance du bouillon : M. Rodet ayant, dans un cas, ensemencé deux petits ballons de bouillon riche, le premier avec une très faible quantité et le second avec plusieurs gouttes d'une culture très riche de charbon virulent, un examen microscopique pratiqué après deux jours faisait voir dans le premier un développement misérable de fila-

ments, des bâtonnets renflés ou en état de désagrégation, et une absence totale de spores, tandis que dans le second la végétation était plus prospère et les spores commençantes étaient nombreuses; après onze jours ce dernier avait beaucoup de spores achevées, on en distinguait à peine quelques-unes imparfaites dans l'autre.

Nous pouvons rapprocher de ces faits ce qui a été observé dans les inoculations aux animaux ; injecte-t-on une petite dose de culture de charbon virulent à un animal sensible, celui ci est malade, mais ne meurt pas ; si on injecte une plus forte dose, l'animal meurt dans les délais normaux.

Les cultures dans de grandes quantités de bouillon furent absolument comparables à des cultures dans de petites quantités, mais où l'ensemencement avait été très faible : les expériences ont été exécutées dans des ballons d'une capacité de plus d'un demi-litre presque remplis de bouillon de culture : on peut donc affirmer qu'il y avait abondance du milieu nutritif.

Nous devons noter comme plus particulier aux cultures en milieux abondants, la tendance à la scissiparité très marquée, et la présence de tubes frisés sinueux et enroulés sur eux-mêmes en forme de crosse ; enfin de deux grandes cultures inégales ayant reçu la même semence, c'est la plus grande qui a donné le plus de filaments sinueux anormaux, la moindre quantité de spores et les spores les plus imparfaites.

Nous concluons sans hésitation que la trop grande abondance du milieu nutritif est défavorable à la végétation et à la sporulation.

Il découle de là une conséquence pratique qui a son

importance : il ne faut pas se contenter d'agir par approximation; il est indispensable d'employer des récipients toujours identiques, et d'ensemencer toujours la même quantité de semence si l'on veut avoir des résultats comparables.

Cette règle doit s'étendre à la culture de tous les microbes, car il est juste de penser que les phénomènes observés ne sont pas propres au *bacillus anthracis*.

Tous les bactériologistes insistent sur la nécessité qu'il y a de faire des cultures dans du bouillon en couche mince, si l'on veut obtenir une belle végétation et surtout une riche production de spores; nous lisons par exemple dans le mémoire de M. Chauveau, *Recherches sur le transformisme en microbiologie pathogène*¹:

« Dans des conditions convenables (bouillon faible, en couche mince, dans matrices à fond plat, sélection des semences, ensemencement abondant), on peut obtenir la race A avec des caractères morphologiques si ressemblants à ceux du bacille virulent, qu'à première vue il est impossible de distinguer les deux agents l'un de l'autre. » Par conséquent, le peu d'épaisseur du bouillon est une des conditions favorables, non seulement au maintien du bon état des cultures de charbon atténué complètement (race A), qui doit être cependant très délicat, mais encore peut leur donner un aspect morphologique identique à celles du charbon le plus virulent.

Cependant plusieurs expériences de M. Rodet semblent prouver qu'il faut peut-être faire jouer un rôle moins

¹ *Archives de médecine expérimentale*, 1889.

considérable à l'épaisseur du bouillon qu'à l'abondance : dans un cas notamment il avaitensemencé faiblement dans les mêmes conditions, deux grands ballons de plus d'un demi-litre, mais dans l'un la hauteur du bouillon était deux fois plus grande (néanmoins la quantité absolue de bouillon était considérable dans chacun d'eux) ; eh bien ! il y eut très peu de spores dans les deux ballons, il y en eut néanmoins légèrement plus dans le second où l'épaisseur était moindre ; il n'y eut pas de différence pour le mycélium qui se développa lentement et sans vigueur : l'influence de la hauteur du bouillon n'est donc pas très remarquable ; celle si minime, que l'on a pu saisir, doit être rapportée plutôt à l'abondance du milieu qui était double dans le ballon où la hauteur du bouillon était aussi double, parce que l'abondance a une action prépondérante.

L'importance attachée par les auteurs au peu d'épaisseur du bouillon doit plutôt être rapportée au peu d'abondance du milieu, qui l'accompagne toujours, et aussi à une oxygénation plus facile dans toute son épaisseur : à l'appui de cette dernière opinion, nous rappellerons une expérience de M. Rodet : onensemence avec la même quantité de culture deux tubes à essai contenant une même quantité de bouillon ordinaire, mais l'un est maintenu incliné, l'autre vertical, de sorte que le bouillon du tube incliné était moins épais, et plus étendu que le bouillon du premier : celui-ci présenta une végétation plus belle et plus riche.

Influence du renouvellement du bouillon.

Depuis longtemps on sait qu'une culture qui n'est pas réensemencée à intervalles relativement rapprochés, dans des bouillons neufs, perd ses caractères morphologiques normaux; alors se montrent les formes d'involution que nous avons déjà décrites; puis les phénomènes de dégénérescence s'accroissent, le protoplasma subit une régression graduelle, bientôt un grand nombre de filaments ne sont plus figurés que par des grains absorbant facilement les matières colorantes disposés suivant une direction plus ou moins rectiligne, indiquant ainsi qu'ils sont les traces de filaments: enfin, on ne rencontre plus que ces grains et quelques spores. C'est pourquoi, depuis longtemps, on sait que, pour conserver une culture, il faut faire des générations successives assez fréquentes; dans ce cas, il n'y a pas de différences notables entre les cultures de la série, si ce n'est les variations que nous avons analysées plus haut.

M. Rodet a eu l'idée de renouveler le milieu nutritif d'une façon permanente; il a imaginé, dans ce but, un dispositif où en même temps qu'une arrivée continue d'aliments toujours neufs, il obtenait un départ égal et incessant des produits de déchet ou de désassimilation, nous allons donner la description de l'appareil employé: il se compose (fig. 5) de trois récipients superposés sur 3 rayons; le récipient moyen où doit se faire la culture est un petit ballon muni de trois tubulures; l'une verticale laisse passer la branche inférieure d'un siphon, l'autre

dirigée obliquement en haut et située un peu au-dessus de la partie moyenne, sert pour l'ensemencement du bouillon qui tombe goutte à goutte par le siphon; la troisième, placée au tiers inférieur, étroite, recourbée en bas, est destinée à l'écoulement du bouillon utilisé, elle se termine dans le récipient inférieur muni à cet effet d'une seule tubulure; le récipient supérieur, rempli de bouillon frais, est un vaste flacon à deux tubulures, dont l'une est destinée à la rentrée de l'air appelé dans l'intérieur et dont l'autre laisse passer la courte branche du siphon qui plonge jusqu'au fond.

Toutes les ouvertures sont garnies de coton qui empêche l'introduction de germes étrangers dans l'appareil tout en permettant l'accès et l'action de l'air.

Grâce au siphon, le bouillon qui remplit le flacon supérieur passe dans le petit ballon où l'on dépose la semence et où va se faire la culture: on effile l'extrémité inférieure du siphon de façon que le débit du bouillon ne soit pas trop considérable, sans quoi l'expérience ne pourrait être prolongée longtemps, à moins d'employer un récipient supérieur énorme; de plus la culture serait entraînée par le mouvement de départ dans le récipient inférieur; généralement on laisse couler une goutte de bouillon de trente secondes en trente secondes, ou de minute en minute.

Dans ces conditions qu'observe-t-on au microscope dans les préparations colorées?

Nous citerons plusieurs expériences:

1° *Expérience: charbon virulent.* — A un jour, tubes longs rares, protoplasma homogène, dans tous les tubes traits de division très nets. Pas de spores.

A deux jours: mêmes caractères.

A trois jours : division des filaments en articles plus petits que dans les précédentes.

A quatre jours : la sporulation commence.

A cinq jours : il y a quelques spores bien formées.

2° *Expérience : charbon virulent.* — A six jours : bacilles en général très courts comme dans le sang charbonneux, les plus longs filaments possèdent des articles en voie de séparation (phénomène rendu très net par la coloration), filaments et bacilles sont homogènes. Pas de spores parfaites, à peine y a-t-il quelques grains réfringents pouvant représenter des spores en formation.

A neuf jours : les pseudo-spores sont plus nombreuses : pas de spores vraiment parfaites.

3° *Expérience : charbon atténué.* — A trois jours ; caractère anormal des bâtonnets, comme dans la culture mère, mais moins anormal que dans la culture sœur en bouillon riche, non renouvelé où la végétation est également moins riche.

La tendance à la segmentation est toujours très marquée. Parfois même les articles sont plus petits que dans le sang. Pas de spores.

4° *Expérience.* — On a pu comparer l'action du renouvellement sur le charbon virulent et sur le charbon atténué.

Dans le cas de charbon virulent il y a un retard considérable dans l'apparition des spores, sinon ajournement ; aux deuxième, troisième et quatrième jours, il n'y avait pas de spores : ce n'est que le cinquième jour qu'apparurent quelques spores rudimentaires ; dans le cas de charbon atténué, il y a eu pauvreté en spores considérable, mais pas disparition.

Le renouvellement du milieu de culture ne favorise donc pas du tout la production des spores, qui se forment bien plus lentement que dans du bouillon ordinaire non renouvelé : cette constatation peut servir d'argument à la théorie généralement admise qui soutient que les spores se développent, quand le milieu cesse de devenir favorable à la végétation, quand la vitalité du microbe est menacée soit par le défaut de nourriture, soit par la présence des produits solubles toxiques, qu'il a fabriqués lui-même.

Les cultures où le bouillon est renouvelé constamment se font encore remarquer par la tendance à la scissiparité qui s'observe dans les filaments : or il y a en général une relation entre l'allongement du mycélium et la formation des spores ; il n'est donc pas étonnant de trouver une scissiparité active avec une suspension de la sporulation.

Nous avons immédiatement saisi la comparaison à établir avec ce qui se passe dans le sang des animaux auxquels on a inoculé du virus charbonneux : là, en effet, jamais de spores, les filaments sont rares, quand ils existent, ils sont toujours petits et divisés en articles courts.

Recherchons les analogies des milieux bouillon et sang, pour nous expliquer les analogies des résultats : nous trouvons la constance de la composition et la richesse en matériaux nutritifs ; nous trouvons aussi l'agitation des milieux ; mais l'influence de ce facteur n'a pas encore été élucidée (M. Arloing).

Nous sommes porté à croire que le premier facteur doit seul être mis en cause.

C'est à la suite de l'observation du développement particulier de la bactériodie dans le sang que l'on espérait obtenir, par un renouvellement incessant du bouillon, une

culture sans spores : ce résultat n'a pas été parfaitement obtenu, mais la sporulation a été suspendue et ajournée d'une façon si manifeste, que peut-être avec une technique meilleure, on arriverait à reproduire ce qu'on a vu dans le sang.

Néanmoins, telles qu'elles sont, nos expériences contribuent à expliquer les particularités du développement du *Bacillus anthracis* injecté dans l'organisme animal, elles nous montrent qu'il ne faut pas désespérer de réaliser un jour *in vitro* toutes les conditions qui se trouvent réunies chez l'être atteint d'une maladie virulente, conditions longtemps réputées insaisissables ; il est inutile de s'étendre sur les résultats qui découlent de leur connaissance, et qui intéressent au plus haut point le médecin et le biologiste.

CHAPITRE II

Bouillon pauvre en matériaux nutritifs

Caractères ordinaires des cultures en bouillon pauvre.

Ici comme dans le chapitre précédent, nous devons commencer par bien établir ce qu'est ce milieu : nous nous contenterons pour cela d'indiquer la manière de le préparer : on ajoute tout simplement de l'eau distillée et stérilisée à du bouillon ordinaire, en proportions variables, suivant ce que l'on veut étudier : et nous dirons bouillons dilués au $1/6$, au $1/11$, au $1/20$, quand pour une partie de bouillon ordinaire riche, il y a 5, 10, 19 parties d'eau, et, de même que nous étions pleinement autorisé à nommer le bouillon ordinaire, bouillon riche, nous nommerons le bouillon dilué, bouillon pauvre.

On serait tenté de croire, *a priori*, que les cultures ne sont pas appréciables à l'œil dans ces milieux dilués ; c'est une erreur, car ils sont la plupart du temps assez trou-

bles : on y voit même des flocons constitués par du mycélium.

Le fait capital dont on est frappé en examinant attentivement les cultures dans des bouillons pauvres, c'est la richesse et la rapidité inaccoutumées de la sporulation, alors que celle-ci est lente et pénible quand on cultive la bactériodie dans des bouillons riches. Il y a en outre une influence favorable jusqu'à un certain point, sur le reste de la végétation.

M. Rodet, frappé de ce qu'avait observé M. Chauveau de ce qu'il avait observé lui-même, concernant les effets de bouillon trop riche, s'attacha à étudier la culture dans des milieux d'une pauvreté nutritive extrême et tout à fait inusitée; il obtint, dans ces conditions, des récoltes de spores surprenantes : en novembre 1888, partant d'une culture de charbon virulent en bouillon riche, le même jour il ensemençait d'une part un bouillon ordinaire et d'autre part un bouillon étendu d'une grande quantité d'eau distillée et stérilisée : on pouvait donc comparer les résultats : dès le lendemain, il voyait dans le dernier un nombre considérable de spores commençantes, tandis que dans le premier il n'y en avait pas traces. Au bout de trois jours il y avait un nombre extraordinaire de spores parfaites, la plupart libres, dans le bouillon pauvre, et à peine quelques rares spores rudimentaires dans le bouillon non dilué : en outre la culture où les spores étaient si abondantes montrait une végétation plus riche et plus normale que la culture mère et la culture sœur.

Des expériences répétées, sur le charbon virulent et le charbon vaccin, donnèrent toutes des résultats semblables ; ceux ci n'ont jamais été publiés, ils ont seu-

lement été mentionnés rapidement dans un mémoire déjà cité de M. Chauveau, qui y fait allusion dans ces termes :

« On a constaté que les bouillons pauvres en matières nutritives se prêtent beaucoup mieux que les bouillons trop riches à un excellent développement morphologique du *bacillus anthracis* et que la culture aboutit vite à la formation de belles spores dans ces milieux nutritifs appauvris. »

Dans le même mémoire nous lisons : « En ce qui concerne mes virus A et B (charbon complètement atténué), j'ai pu en les propageant dans des bouillons appropriés fort pauvres en matières nutritives, obtenir rapidement de riches cultures abondantes en spores comparables par leurs caractère morphologique et vigueur apparente à celles qui résultent de la prolifération du *bacillus anthracis* le plus virulent. »

Nous allons rapporter quelques expériences personnelles dans lesquelles nous avons fait varier le degré de dilution et qui ont porté sur des échantillons de virus charbonneux à des états divers de virulence.

Expérience. — Ayantensemencé plusieurs gouttes de sang du cœur d'un cobaye mort du charbon dans deux ballons, l'un de bouillon ordinaire, l'autre de bouillon dilué à 1 pour 20 ; après deux jours ce dernier examiné au microscope (fig. 4) présentait une abondance remarquable de très longs tubes, la plupart enchevêtrés, entortillés à segmentation assez prononcée et littéralement bourrés de spores parfaites ; on distinguait aussi un certain nombre de spores libres. La culture en bouillon riche (fig. 3) ne présentait au contraire, que des bâtonnets courts isolés ou

réunis pas trois ou quatre, et à peine quelques spores commençantes.

Expérience. — La culture mère avait été ensemencée par du sang de cobaye : on la transplante comme dans le cas précédent dans deux bouillons, riche et pauvre ; au bout d'un jour les spores commencent à se développer dans le bouillon pauvre, et au bout de trois jours elles étaient achevées et extraordinairement nombreuses ; dans le bouillon riche on ne trouvait que de rares spores, achevées également ; les filaments mycéliens sont bien moins longs que dans la culture en bouillon pauvre ; ce qu'il y a de plus saillant dans ces cultures en bouillon très dilué, c'est la richesse extraordinaire de la sporulation ; incidemment on note une grande longueur des filaments et l'on trouve ici une relation que nous pouvons donner comme un fait assez général, *l'allongement du mycélium et la formation des spores* ; nous croyons devoir rapprocher de ce résultat ce que nous avons observé dans les cultures en cours, en bouillon ordinaire : c'est tout à fait au début de la culture que la scissiparité est la plus active, tandis que plus tard les filaments s'allongent au moment de donner des spores ; il est légitime de penser que c'est l'appauvrissement du milieu nutritif par les cellules elles-mêmes, qui est la cause de cette évolution morphologique.

**Influence de la nature et de la qualité de la semence
sur les cultures en bouillon pauvre.**

L'influence du bouillon dilué, que nous venons d'indiquer, se retrouve toujours, mais plus ou moins accentuée suivant la qualité de la semence, c'est-à-dire l'état physiologique du microbe ; nous avons cultivé le charbon à différents degrés de virulence, et le *bacillus anthracis* atténué nous a donné d'une manière générale le même résultat, accroissement de la richesse en spores, mais moins sensible que pour le *bacillus anthracis* virulent ; un grand nombre d'examen de préparations microscopiques nous l'ont appris : par conséquent, l'aptitude à faire des spores est légèrement affaiblie dans la bacteridie charbonneuse atténuée et comme cette faculté doit être fonction de la vitalité, celle-ci est sans doute atteinte aussi ; autre chose encore à l'appui de cette notion de la dégénérescence relative du charbon atténué, c'est la forme des spores, qui sont sphériques, un peu inégales et irrégulières, tandis que le charbon virulent a des spores ovoïdes allongées.

Cette différence d'effets du bouillon pauvre est plus ou moins marquée suivant le degré d'atténuation du *bacillus anthracis* qui y est cultivé.

La récolte des spores est également inférieure à ce qu'elle est d'habitude, quand la semence est vieille, et de ce chef plus ou moins altérée ; à ce sujet nous ne pouvons faire autrement que de signaler une observation très intéressante dans laquelle la faculté sporogène ou l'aptitude à

faire des spores, qui ne se manifestait que médiocrement sous l'influence du bouillon pauvre, s'est accrue à la suite d'un passage en bouillon riche : la semence provenait d'une vieille culture de charbon vaccin : transportée dans du bouillon pauvre elle donna de jolies spores, mais rares ; cette culture en bouillon dilué fut alors transplantée dans un bouillon riche ; les générations en milieu pauvre, dont ce dernier fut le point de départ, se sont distinguées par l'abondance des spores, qu'on avait l'habitude d'observer dans ces circonstances.

Qu'arrive-t-il si la semence provient d'une culture jeune en milieu nutritif riche, nous l'avons vu au commencement de ce chapitre, seulement ce milieu nutritif peut être le sang d'un animal : dans ce cas la culture en bouillon pauvre offre des caractères particuliers : elle se ressent vivement de l'origine de la semence ; les filaments et les tubes ne sont pas très longs, de plus, ils ont une tendance assez marquée à la segmentation ; néanmoins la sporulation est très active.

Influence particulière du bouillon pauvre sur le mycélium.

Nous venons d'insister principalement sur ce qui a trait à la sporulation, dans les milieux pauvres ; mais les effets de la dilution se font aussi sentir sur les éléments mycéliens, nous en avons déjà parlé en divers endroits, nous devons ici ajouter quelques détails complémentaires ; ces effets de la dilution sont bons et mauvais :

1° Nous avons signalé plusieurs fois dans nos descrip-

tions précédentes l'allongement considérable et rapide du mycélium qui est peu segmenté (fig. 1 et 4). Dans notre chapitre premier, nous avons reconnu la disparition ou tout au moins la diminution des formes monstrueuses sous l'influence des cultures en bouillon pauvre : une expérience nous a montré ces formes persistant dans une culture en bouillon riche, alors que la morphologie était bien plus normale dans une culture sœur en bouillon pauvre.

2° Les mauvais effets sont très intéressants, car ils sont pour ainsi dire caractéristiques de la culture en bouillon dilué, et ils sont d'autant plus accusés que la semence est de nature ou de qualité plus défectueuse, d'autant plus accusés aussi que les générations sont plus répétées : des filaments (fig. 2) perdent leur aspect cylindrique, se dilatant en certains points plus ou moins rapprochés, de sorte qu'ils prennent parfois un aspect moniliforme ; ils sont en même temps peu colorés, souvent très pâles : ils sont constitués par des éléments en fuseau, ayant comme épaisseur trois ou quatre fois celle d'un bâtonnet normal. Ils donnent absolument l'idée de bâtonnets infiltrés, oedématiés si l'on veut nous permettre ce qualificatif. Les éléments contiennent à peine quelques grains colorés à leurs extrémités, restes sans doute du protoplasma dégénéré ; dans l'axe de certains filaments pâles on trouve de petites bandes fragmentées, très vivement colorées ; ces dernières formes rappellent absolument les formes rencontrées par Phisalix¹ dans les coagulum du cœur des souris qui ont succombé à l'inoculation de culture chauffée

¹ *Mémoires et Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1892.

à 42 degrés. Enfin, par endroits, dans la préparation, on voit des grains très colorés, rapprochés, disposés d'une façon plus ou moins rectiligne, indiquant que des filaments mycéliens se sont désagrégés presque complètement. Les bâtonnets normaux qui restent sont ou réunis entre eux ou disséminés au milieu des formes dégénérées.

Curt Braem ¹ étudiant les phénomènes de dégénérescence des bacilles pathogènes cultivés dans l'eau distillée, dit que celle-ci est un milieu destructif pour tous les microbes (charbon, choléra, staphylococcus, etc.), sauf pour le bacille typhique ; il s'étend longuement sur les formes de dégénérescence de la bactériodie, et il en distingue quatre catégories, dont la troisième et la quatrième doivent nous arrêter, car elles renferment précisément des formes analogues à celles que nous avons décrites : des vacuoles apparaissent dans la substance cellulaire, les contours du bacille gonflent, s'élargissent plus dans le sens transversal que longitudinal et prennent une forme de fuseau aux extrémités arrondies ; enfin tout finit par un sac ellipsoïdal à parois distendues et rempli d'un liquide incolore ; au bout de trente-six jours tous les filaments se trouvent passés à cet état de dégénérescence, mais on en trouve déjà des exemples au bout de quarante-huit heures et avec le temps leur nombre ne fait que s'accroître, ce qui démontre une différence énorme de résistance dans les bacilles d'une même culture, vis-à-vis de l'action destructive du milieu, différence qui peut même apparaître entre les différents articles d'un même filament.

Voilà ce qu'il range dans la troisième catégorie ; dans

¹ *Beiträge z. pathol. Anat. Ziegler*, Bd. VII, premier livre.

la quatrième l'altération est à peu près semblable : les contours du bacille deviennent gonflés, la substance interne apparaît comme divisée en carrés par des lignes plus claires que le reste, disposées d'aplomb ou un peu obliquement, par rapport aux parois latérales du bacille. Plus tard, les bacilles de cette catégorie gonflent et s'agrandissent plus que tous les autres et prennent des formes arrondies ou ovales, celles d'une massue, d'une bouteille, d'un fuseau, etc.

Curt Braem a vu que les bactériidies charbonneuses mortes dans le sac lymphatique de la grenouille passent par les mêmes stades d'altération que celle de l'eau distillée, à cette différence près que le processus y va avec plus de rapidité ; dans la solution physiologique de sel marin l'auteur a trouvé les mêmes phénomènes.

De cette série de faits il conclut que, dans toutes les conditions énumérées, les bactéries meurent par une seule et même cause de destruction, c'est-à-dire le manque de substances nutritives dans le milieu.

Si nous avons tenu à citer ces observations, c'est pour bien faire voir que nos cultures en bouillon pauvre sont un terme de passage, une transition entre les cultures en bouillon riche et les cultures en eau distillée, qu'il n'y a par conséquent rien d'étonnant qu'on y ait rencontré des formes de dégénérescence.

Influence de la pauvreté croissante du milieu nutritif.

Nous nous sommes demandé si, en affaiblissant de plus en plus la valeur nutritive du bouillon en le diluant, nous verrions une augmentation de même sens de l'action favorable, en un mot, s'il y avait relation indéfiniment directe entre celle-ci et la pauvreté du milieu ; nos expériences nous ont prouvé qu'il ne fallait pas dépasser un certain degré de dilution. Dans tous les cas le mycélium paraît moins souffrir que les spores : pour le charbon-vaccin, les cultures en bouillon dilué au $1/6$ sont plus riches et surtout contiennent beaucoup plus de spores que les cultures en bouillon au $1/11$; nous ne pouvons conclure pour le charbon virulent, parce que, même dans les bouillons dilués au $1/20$, nous avons obtenu une végétation et une sporulation magnifiques (fig. 4) ; tout ce que l'on peut dire, c'est que le charbon virulent est beaucoup moins sensible à l'action de la dilution que le charbon atténué : nous avons fait des cultures des deux races dans du bouillon également pauvre : or, celle de charbon virulent était riche en spores bien formées ; celle, au contraire, de charbon atténué en renfermait peu et encore n'étaient-elles pas bien développées ; par conséquent, on peut pousser beaucoup plus loin la limite de dilution compatible avec un bon état de la végétation, dans le cas de charbon virulent ; en un mot, le microbe se montre

d'autant plus exigeant sous le rapport de la quantité d'aliment à lui fournir, qu'il est moins normal.

Il est probable qu'il n'y a pas, sinon pour le charbon vaccin, un optimum bien fixe de dilution, puisque MM. Buchner, Straus et Dubarry, cultivant des bactéries charbonneuses sans spores dans l'eau distillée, ont remarqué un développement de spores.

MM. Straus et Dubarry concluent leur étude¹ par une considération pratique intéressante : « Dans le *bacillus anthracis*, nous avons démontré que, placé dans de l'eau distillée pure, il est susceptible d'y donner naissance à des spores, cette propriété existe probablement pour d'autres microbes pathogènes; c'est probablement pour cela que dans nos expériences comme dans celles de nos prédécesseurs, des bacilles aptes à donner des spores se sont généralement montrés plus résistants au séjour dans l'eau que les microcoques (pour lesquels on ne connaît pas de forme durable). »

Influence de la répétition des générations.

On est tout disposé à croire que si l'on répète les générations en bouillon pauvre, les effets s'accumuleront et que dans les dernières générations la végétation et la sporulation seront encore plus belles que dans les premières : nous avons éprouvé cette hypothèse, et, après plusieurs expériences nous avons reconnu qu'elle n'était pas justifiée :

¹ *Archives de médecine expérimentale*, 1889.

Si, dans la première ou la deuxième culture en bouillon pauvre (fig 1, 2^e génération au 1/6 charbon vaccin), la généralité des filaments présente une épaisseur uniforme qui est un peu plus grande que dans les cultures de bouillon riche, si le protoplasma est dans la plupart d'entre eux homogène et bien coloré, si la formation des spores est exagérée, il n'en est plus de même chez les générations suivantes (fig. 2, 4^e génération au 1/6 charbon vaccin) : le mycélium s'altère de plus en plus, il finit par présenter dans son ensemble, au maximum, les phénomènes de dégénérescence énumérés plus haut.

Quant aux spores, elles deviennent de moins en moins nombreuses, de moins en moins uniformes : nous avons noté une disposition fréquente de ces spores dans les filaments, qui nous a semblé spéciale à la culture en bouillon dilué : elles distendent la paroi d'un côté seulement, au lieu de la dilater uniformément des deux côtés. Nous les avons pour cela appelées *spores latérales* ; puis on finit par ne plus voir que des spores commençantes, imparfaites ou rudimentaires, que M. Chauveau appelle pseudo-spores : c'est le moment d'insister un peu sur le sens à attribuer à ces expressions que nous avons déjà employées fréquemment : il faut entendre par là des portions très limitées des bâtonnets, faiblement colorées et faiblement réfringentes, sans forme bien déterminée, ce sont en effet plutôt des points ; en tout cas, elles sont de dimension moindre que les spores ordinaires ; nous avons coloré toutes nos préparations par le bleu de méthylène seul ; on nous reprochera peut-être de ne pas avoir procédé par double coloration et juger ainsi de la nature véritable de ces pseudo-spores ; le temps nous a manqué, en outre

M. Chauveau a remarqué que ces formes étaient susceptibles de se colorer comme le protoplasma : par conséquent, la double coloration peut donner des résultats négatifs relativement aux spores au début de leur développement, alors que la coloration simple peut les révéler comme nous venons de le voir.

Nous arrivons maintenant tout naturellement à des recherches, que nous avons entreprises dans le but de remédier à la dégénérescence et à l'affaiblissement, qui résultent de la répétition des générations en bouillon pauvre ; nous avons pensé que, si la bactériodie souffrait pour ainsi dire d'inanition, elle pourrait recouvrer toutes ses propriétés si on la plaçait quelque temps dans un milieu riche en matières nutritives : nous possédons une série de trois cultures successives de charbon vaccin en bouillon dilué au $1/6$; la troisième vieille de quarante jours, par suite très altérée a été semée dans du bouillon ordinaire et de là dans du bouillon dilué au $1/20$; dans cette dernière génération, la végétation a été bien plus riche et bien plus normale que dans les deux qui l'avaient précédée, le nombre et la perfection des spores bien plus grands ; nous pouvons rapprocher ce résultat de l'expérience suivante très intéressante au point de vue de la biologie et de la médecine expérimentale ; elle a été faite avec du charbon virulent : à cause de la vieillesse de la semence, une culture en bouillon pauvre n'avait pas donné un résultat satisfaisant ; nous nous sommes proposé de la régénérer, pour cela nous avons employé deux moyens qui sont presque identiques, quant à leurs effets sur la végétation en général : ces moyens consistent à faire passer la culture affaiblie, d'un côté dans

l'organisme animal et d'un autre dans un bouillon riche : quelques gouttes du sang du cobaye mort et quelques gouttes de la jeune culture en bouillon riche, semées dans deux ballons de bouillon dilué au 1/20, donnèrent lieu à une végétation et à une sporulation magnifiques (fig. 4 pour la culture du sang), absolument différente de la culture initiale.

Comme conclusion de ces deux faits, on peut dire que, pour obtenir les bons effets du milieu pauvre, il faut se servir d'une semence qui ne soit pas affaiblie par des passages répétés en bouillon pauvre, ni par le vieillissement.

Nature des phénomènes observés dans la culture en bouillon pauvre

Quoi qu'il en soit, la culture dans des milieux assez peu riches en matières nutritives est excessivement favorable à la sporulation et jusqu'à un certain point au mycélium, Du moins dans les premières générations ; il y a lieu de se demander s'il y a dans ces faits l'indice d'une modification intime et profonde de la bactériologie. Des bactériologistes ont créé par des moyens spéciaux une race de charbon qui ne donne plus de spores et qu'ils ont pour ce motif appelé charbon asporogène ; serions-nous parvenu à créer de même une race particulière de charbon, essentiellement apte à faire des spores. Non, il n'y a pas d'exaltation de la faculté sporogène, c'est seulement la manifestation de cette faculté qui s'accroît en présence du bouillon pauvre, mais l'aptitude à faire des spores n'est

pas accrue, l'amélioration des propriétés de la bactériodie est plus apparente que réelle, elle s'accompagne de phénomènes de dégénérescence qui augmentent, si l'on multiplie les passages en milieu dilué.

Tout ce qui va suivre d'ailleurs va nous éclairer sur la question :

Expérience. — Une culture récente en bouillon pauvre dont tous les tubes très abondants étaient presque remplis de spores, est semée dans un bouillon riche; on n'est pas peu surpris de voir cette dernière culture présenter les caractères ordinaires d'une culture en bouillon riche, pas la moindre trace de la végétation et de la sporulation extraordinaire de la semence.

Beaucoup d'expériences semblables furent faites dans la suite, jamais on ne vit se transmettre la faculté sporogène avec l'intensité qui avait étonné dans les cultures en milieu pauvre.

Que devient la vitalité dans les cultures en bouillon pauvre?

Les recherches microscopiques sur l'ensemble des caractères morphologiques (végétation et sporulation) nous démontrèrent donc qu'il faut mettre en doute une influence vraiment favorable, des bouillons dilués, vis-à-vis du charbon; les faits observés par nous, touchant certaines propriétés vitales proprement dites (notamment résistance à l'action de la chaleur et au vieillissement) nous révèlent que cette influence est plutôt défavorable.

a) RÉSISTANCE A LA CHALEUR

Expériences. — Nous avons cru que le bon aspect extérieur des cultures en bouillon pauvre répondait à une augmentation ou du moins au maintien de la vitalité; c'est pourquoi la résistance à la chaleur, qui doit en être certainement une manifestation, a été essayé.

On lit dans tous les ouvrages qu'en chauffant quelque temps une culture de charbon à une température oscillant autour de 80 degrés, on détruit toutes les cellules bactériennes et il ne subsiste que les spores, regardées par tout le monde comme des formes durables par excellence; nous discuterons plus bas cette durabilité.

M. Arloing¹ écrit que les bacilles sporogènes exigent, pour être détruits : des températures élevées, 110 à 125 degrés pendant quelques minutes. Flugge² dit que les spores charbonneuses sont détruites quand on les expose deux minutes à 140 degrés.

Nous citons ces chiffres pour montrer que nous n'avons pas employé une température susceptible de tuer les spores, d'après les faits connus; en effet elle a varié de 81 à 83 degrés.

Dans nos expériences nous avons employé la méthode suivante que nous a enseignée M. Rodet : on brise l'extrémité effilée d'une pipette capillaire ordinaire, on aspire une certaine quantité de la culture à éprouver, on ferme ensuite cette extrémité à la lampe, en veillant à ce que la chaleur élevée de la flamme n'agisse pas sur la prépa-

¹ *Les Virus.*

² *Les Microorganismes.*

ration, qui d'ailleurs s'éloigne d'elle-même, grâce à la dilatation de l'air; puis on suspend la pipette verticalement à l'aide d'un fil, dans un bain d'eau maintenue à la température voulue à l'aide d'un régulateur interposé sur la conduite de gaz. La vaporisation d'une certaine quantité du bouillon de culture ne donne pas lieu à une augmentation de la pression, car le dégagement de vapeur est libre par la grosse extrémité de la pipette fermée avec du coton.

Par cette méthode nous éprouvons le même jour, la résistance à la chaleur du charbon vaccin cultivé depuis un mois d'une part en bouillon riche (2^e génération) et d'autre part en bouillon dilué au 1/6 (1^{re} génération); nous nous sommes assuré par des préparations microscopiques que les deux cultures renfermaient des spores; on les exposa treize minutes à 83 degrés, après quoi, elles furent semées dans deux bouillons ordinaires; le premier,ensemencé avec la culture en bouillon riche, se troublait au bout de vingt-quatre heures, le second restait indéfiniment clair. Nous nous attendions à voir la culture au 1/6 présenter une résistance sinon plus grande, du moins égale, vu la perfection et l'abondance des spores et c'était l'inverse que nous obtenions; nous fûmes curieux de chercher combien de temps devait agir la température de 83 degrés, pour n'être pas mortelle aux spores de cette culture.

Dans ce but, nous avons exécuté trois expériences simultanées; quinze jours après la première la culture renfermait encore des spores en assez grand nombre; nous avons même fait un ensemencement témoin qui a été positif.

Exposée successivement huit, quatre et une minute à

83 degrés et transplantée en bouillon ordinaire, dans aucun cas il n'y eut prolifération; nous avons tué les spores.

Le charbon virulent n'a pas été aussi profondément touché par l'inanition relative; nous avons constaté (malheureusement nous n'avons qu'une expérience) qu'après exposition de treize minutes à 83 degrés, une culture de charbon vaccin en bouillon dilué au 1/6 était frappée de mort, tandis que, dans les mêmes conditions, une culture de même âge de charbon virulent en bouillon dilué au 1/11, c'est-à-dire une fois plus pauvre, était parfaitement fertile et donnait très rapidement une végétation très riche.

Cette expérience est instructive, elle nous enseigne que le charbon atténué est séparé d'une façon profonde du charbon virulent; il importe peut-être d'attribuer une grande valeur à la résistance des spores à la chaleur, pour les distinguer l'un de l'autre. M. Chauveau dit qu'il y a deux moyens surtout d'apprécier la variabilité dans le monde des agents infectieux.

a) En général la variabilité se traduit par les changements de forme qui sont imprimés aux espèces.

b) Pour les agents pathogènes, ce sont plutôt les modifications qu'éprouvent leurs propriétés infectieuses, ou mieux, l'action physiologique de ces agents.

D'après ce même auteur, la variabilité chez ces microbes pathogènes se traduit moins par des modifications de forme, que par des changements d'activité physiologique.

Cette variabilité ne se traduirait-elle pas par des changements importants de la résistance des spores à la chaleur? Il y a sans doute là un élément important de différenciation des races d'une même espèce.

Nous nous sommes demandé à quelle cause devait être rapportée cette chute de la vitalité des spores du charbon atténué cultivé en bouillon pauvre ; tous les bactériologistes signalent la difficulté qu'il y a à détruire des spores sèches :

Flugge ¹ dit que, dans les liquides, les spores meurent beaucoup plus rapidement que dans les cultures desséchées.

Il semble, ajoute-t-il, que le changement du protoplasma caractéristique de la mort se produit beaucoup plus facilement avec une certaine teneur en eau du protoplasma, qu'à l'état entièrement sec.

M. Arloing ², se plaçant au point de vue pratique, écrit : Il faut tenir grand compte de l'état sous lequel se trouvent les virus dans les objets à désinfecter ; à l'état frais, les viruss porulés sont plus faciles à détruire ; on devra donc éviter autant que possible de les laisser se dessécher, avant la tentative de désinfection.

Si la dessiccation n'a pu être évitée, on fera sagement d'employer une température supérieure à celle qui tue le virus frais et de l'employer plus longtemps que ne l'indiquent les recherches de laboratoire. Nous fixerons les idées par un exemple : la sérosité virulente du charbon symptomatique est stérilisée par la température de 100 degrés appliquée pendant vingt minutes ; si la sérosité a été desséchée, puis hydratée, avant d'être soumise à l'action de la chaleur, il faut, pour la stériliser, la chauffer à 160 degrés pendant six heures.

On est parfaitement pénétré de ces différences dans les

¹ *Loc. cit.*

² *Loc. cit.*

laboratoire de bactériologie ; aussi les bouillons, les milieux de culture en général y sont stérilisés par des températures de 100 à 115 degrés ; les objets en verre par des températures supérieures à 200 degrés.

Il est logique de penser que, dans nos cultures diluées, les spores et les bacilles se trouvant dans un état d'humidité et d'imbibition plus marqué que dans les cultures en bouillon ordinaire plus concentré, la chaleur a produit ses effets plus promptement.

b) RÉSISTANCE AU VIEILLISSEMENT

Mais ce qu'il y a de non moins remarquable que le peu de résistance à la chaleur, des cultures de charbon vaccin en bouillon pauvre, c'est leur peu de résistance au vieillissement : nous avons fait cette observation incidemment, comme nous voulions régénérer nos cultures en bouillon dilué, par un passage en bouillon riche ; nous avons été étonné qu'une culture au 1/11 de la troisième génération fût stérile après un mois, alors que la culture mère, également au 1/11, âgée d'un mois et demi, et ensemencée dans du bouillon riche, donnait des cultures abondantes.

Tous ces faits sont exploitables à deux points de vue : ils nous montrent d'un côté que la pauvreté du milieu est loin d'être efficacement favorable à la vigueur et à la résistance de la végétation, et de l'autre que la répétition des générations en bouillon dilué est nettement défavorable.

DEUXIÈME PARTIE

Influence des précédentes conditions de culture sur la virulence.

Nous avons parlé, dans l'introduction, des relations qui existent, peut-être, entre la virulence et la faculté sporogène, et du grand intérêt qu'il y aurait à rechercher les variations simultanées de l'une et de l'autre ; la logique et l'unité du sujet exigeraient que les différentes données que nous allons rapporter et réunir dans cette deuxième partie, fussent disséminées et disposées chacune à leur place dans le cours de la première partie ; mais l'étude de la virulence est tellement importante au point de vue médical proprement dit, que malgré les rapports étroits qui doivent relier les variations de la virulence aux variations des caractères végétatifs, nous avons préféré en faire un chapitre à part qui malheureusement n'aura pas le développement qu'il mérite.

Pour la clarté et la facilité de l'exposé, nous suivrons

le même ordre que dans la première partie ; de cette façon, on pourra se reporter rapidement à ce qui a été dit au sujet des caractères végétatifs et saisir les rapports.

Richesse et abondance du bouillon.

Le bouillon ordinaire a une influence nuisible sur la virulence, quelle qu'elle soit, du *bacillus anthracis*, M. Chauveau l'a suffisamment prouvé. S'il se produit une diminution d'activité virulente sous l'influence du bouillon riche, ce peut être une atténuation vraie, transmissible, mais ce peut être aussi, comme cela nous paraît résulter d'un certain nombre d'observations faites par M. Rodet, une atténuation apparente, sur laquelle nous allons nous expliquer :

Une culture de charbon virulent en bouillon riche, inoculée à un cobaye, n'a pas tué à l'âge de six jours, et elle a tué à l'âge de trente-cinq jours ; dans un autre cas, une inoculation de charbon virulent faite à un cobaye, après dix-huit jours de culture en bouillon ordinaire, n'a pas provoqué la mort, tandis que l'animal, inoculé avec la même culture, après quarante-cinq jours, succombait dans les délais normaux. Il résulte de cela qu'une même culture, en apparence atténuée, reprend sa virulence au bout d'un certain laps de temps : or, nous savons que les spores du *bacillus anthracis* sont peu abondantes, se forment et s'achèvent lentement dans les bouillons riches ; par conséquent, au début, la culture inoculée aux animaux doit avoir une faible efficacité, puisqu'on inocule

un petit nombre de spores et que ce sont surtout les spores qui agissent; il n'en est plus de même quand on a affaire à une culture plus âgée : là, en effet, les spores sont parfaites et en plus grande quantité : il semble donc légitime d'expliquer l'apparition de la virulence dans une culture primitivement inactive, par l'achèvement de la sporulation; voici une autre expérience qui parle dans le même sens : une culture de charbon virulent ne tuait le cobaye qu'à un âge avancé, sa fille le tuait, au contraire, au bout de quelques jours seulement de culture; or, les examens microscopiques nous ont montré une sporulation plus abondante et plus rapide dans cette dernière que dans la culture mère.

Par conséquent, la virulence peut être masquée par la rareté ou l'imperfection des spores : nous concluons que la richesse du milieu est défavorable à l'activité de la culture, soit en provoquant une atténuation proprement dite (M. Chauveau), soit en déterminant une atténuation simplement apparente, par défaut de spores.

L'abondance plus ou moins grande du milieu nutritif a aussi une influence marquée sur l'activité des cultures, mais ici encore il faut faire la distinction entre l'atténuation réelle et l'atténuation apparente. Si dans une expérience nous avons vu l'inoculation d'une dose ordinaire de grande culture de charbon virulent, être inoffensive pour le cobaye, ce fait doit être attribué à la raison que nous venons de discuter; il doit nous suggérer les mêmes réflexions, car nous connaissons l'influence tout à fait défavorable de l'abondance du milieu sur la sporulation.

Renouvellement du bouillon.

Il est intéressant de savoir ce que peut sur la virulence, cette condition négative si puissante sur la sporulation ; deux essais ont été tentés, sans donner des résultats bien précis ; dans un cas la culture renouvelée, inoculée à un cobaye a été inefficace, mais sa sœur en bouillon ordinaire non renouvelé, l'a été également ; dans un autre cas, une culture renouvelée a tué dans le même délai que sa sœur. Nous sommes en droit de croire que le renouvellement continu n'a pas une influence particulière sur la virulence, si ce n'est en retardant ou même en empêchant l'apparition des spores dans les cultures qui y sont soumises. C'est une étude à reprendre, car il serait important de savoir d'une part si cette méthode de culture permet de suspendre indéfiniment la sporulation et d'autre part ce que devient parallèlement la virulence.

Pauvreté du bouillon.

Nous abordons l'étude de la virulence dans les cultures en milieu contenant peu de matériaux nutritifs ; ce qui avait principalement frappé, au point de vue botanique, c'était l'abondance considérable des spores, et l'on pouvait présumer un rehaussement de la virulence, en rapport avec une exaltation apparente de la faculté spo-

rogène; il y avait lieu de rechercher si cette condition n'était pas capable d'exalter le charbon atténué ou même de restituer la virulence au charbon absolument inactif; M. Chauveau dit dans un mémoire déjà cité :

« On a constaté (M. Rodet) que les bouillons pauvres en matières nutritives, se prêtent beaucoup mieux que les bouillons trop riches, à un excellent développement morphologique du *bacillus anthracis* et que la culture aboutit vite à la formation de belles spores, dans ces milieux nutritifs appauvris. Peut-être, cette pauvreté est-elle aussi une condition favorable au développement de la virulence, et pourrait-on, en mettant cette condition en œuvre, arriver à la reconstitution de la propriété infectieuse dans les cultures où elle a disparu. »

D'ailleurs, M. Rodet avait vu la virulence s'exalter dans une culture de sang charbonneux dans l'eau distillée : n'était-ce pas la pauvreté du milieu qui était la condition déterminante de l'exaltation ?

M. Chauveau employait, à différents degrés de dilution, un bouillon ordinaire, moitié moins riche en aliments que le bouillon type indiqué au commencement de ce travail ; il l'étendait d'eau distillée et stérilisée dans les rapports de $1/2$, $1/4$, $1/8$. Il a été jusqu'à la quatrième génération de culture en bouillon dilué, il l'a inoculée à ce moment à la souris, animal très sensible à l'action du charbon : l'expérience fut négative, l'animal ne fut pas affecté le moins du monde ; on verra plus loin, ajoutait-il, qu'il faut se garder de voir, dans les résultats négatifs, la preuve que le plus ou moins de richesse du bouillon reste sans influence ; en effet, il a fait des expériences où au bouillon faiblement concentré il ajoute

quelques gouttes de sang : « la prolifération bacillaire s'opère vite et bien dans le bouillon sanguinolent dilué au $1/8$; au bout de huit jours on trouve sous le microscope de belles touffes en filaments et du mycélium fragmenté en segments, dont bon nombre excessivement courts ; il existe des spores libres pour la plupart : la virulence de la race est rétablie, non seulement pour la souris, mais pour le cobaye adulte » ; d'après cela, nous avons pensé que dans l'expérience rapportée plus haut (culture de sang charbonneux dans l'eau distillée), c'était la présence du sang plutôt que la pauvreté nutritive du milieu, qui avait exalté la virulence.

Il ressort de tous ces faits que la pauvreté du milieu ne suffit pas pour réveiller la virulence disparue ; il y avait lieu de voir ce qui se passerait, en opérant de même, avec un bacille dont l'atténuation serait moins profonde ; nous avons constaté personnellement, que le charbon non totalement atténué, à la troisième génération en bouillon dilué au $1/6$, n'acquerrait pas une virulence plus forte, et cependant ce charbon était plus susceptible d'exaltation que le charbon complètement inactif où la virulence était peut-être détruite à tout jamais.

Bien plus, nous avons cru remarquer que la virulence du charbon ordinaire loin d'être accru par le passage dans un bouillon dilué au $1/11$ était bien plutôt affaiblie, car un cobaye inoculé ne mourait qu'au bout de quatre jours, ce qui est une évolution lente, la mort survenant d'habitude dans les quarante-huit heures. Ces expériences ne confirment pas l'espoir qu'on avait eu, de rehausser la virulence par la culture en bouillon très pauvre ; à première vue on pourrait trouver une contradiction à la loi

assez générale du parallélisme des variations dans les propriétés botaniques et les propriétés pathogènes ; mais la contradiction n'existe pas, puisque nous avons reconnu que l'accroissement de la sporulation, sous l'influence du bouillon pauvre, est purement momentané, que la propriété sporogène ou l'aptitude à faire des spores n'est en réalité pas améliorée ; somme toute, il n'y a par la culture en bouillon pauvre aucun vrai bénéfice acquis.

CONCLUSIONS

I. Les caractères botaniques du *bacillus anthracis* sont fâcheusement influencés par l'abondance du milieu de culture et par une haute teneur en principes dissous ; ces conditions ont particulièrement pour effet, de restreindre la production des spores.

II. Le renouvellement incessant du bouillon active la scissiparité ; il retarde et appauvrit considérablement la sporulation ; peut-être même est-il capable de la suspendre indéfiniment.

III. La richesse et l'abondance du milieu sont défavorables à la conservation du pouvoir pathogène ; elles peuvent suffire à déterminer une certaine atténuation de la virulence.

IV. Un milieu nutritif très pauvre est éminemment favorable à la formation des spores ; dans du bouillon fortement dilué, celles-ci se développent avec une rapidité et une abondance surprenantes.

La pauvreté nutritive du milieu détermine des altéra-

tions particulières du protoplasma mycélien; mais, par contre, elle est capable d'améliorer certaines déviations anormales ou monstrueuses des caractères morphologiques.

V. L'influence de la pauvreté du bouillon sur la sporulation, très accentuée pour le bacille virulent; s'observe aussi avec le microbe atténué, mais d'une façon moins marquée; ce dernier ne nous a pas donné, même dans les meilleures conditions, des récoltes de spores aussi belles que le bacille virulent.

VI. L'influence favorisante du bouillon pauvre sur la sporulation est purement momentanée; il n'y a pas de rehaussement de l'aptitude à faire des spores.

La répétition des générations en milieu très pauvre, loin d'accentuer l'abondance des spores, l'amoindrit plutôt. Les spores formées dans le bouillon très pauvre, au moins pour le bacille atténué, sont douées d'une résistance moindre que celles qui prennent naissance dans un bouillon riche.

VII. Le phénomène est d'autant plus marqué que la semence est plus vigoureuse : des germes vieillis conviennent mal; une semence tirée d'une culture jeune en milieu riche se prête bien à l'effet du bouillon dilué et mieux encore, celle qui provient du sang charbonneux de cobaye.

VIII. Il n'y a pas d'accroissement du pouvoir pathogène, en rapport avec la richesse de la sporulation; la répétition des générations en milieu très pauvre ne nous a pas paru capable de rehausser la virulence diminuée,

pas plus qu'elle ne suffit (Chauveau) à restituer la virulence complètement perdue.

IX. Il n'y a donc pas, sous l'influence du milieu très pauvre, de bénéfice acquis, ni pour la propriété virulente, ni pour la faculté sporogène.

Si une grande pauvreté du milieu exalte la manifestation de certaines propriétés, c'est d'une manière purement momentanée, et, en définitive, cette condition est défavorable à la vitalité, elle est affaiblissante.

C'est un milieu de concentration moyenne, qui convient le mieux pour maintenir, aussi intacte que possible, la vitalité du *bacillus anthracis*.

X. Il y a lieu, dans la préparation des bouillons de culture, de se préoccuper, plus qu'on ne le fait ordinairement, de l'influence que peut avoir la teneur en eau ; il serait, sans doute, utile de faire varier la concentration des milieux suivant les microbes, et, pour la même espèce, suivant le but que l'on se propose, et le genre de récolte que l'on veut obtenir. Il y a lieu aussi de se mettre en garde contre les changements que les opérations de stérilisation, le mode d'incubation et de conservation des cultures, peuvent faire subir à la concentration des milieux.

Vu, bon à imprimer :

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,
ARLOING

Vu, bon à imprimer

POUR LE DOYEN, L'ASSÉSSEUR,
A. GAYET

Vu, bon et permis d'imprimer :

LE RECTEUR,
EM. CHARLES.



Fig. 1.



Fig. 2.



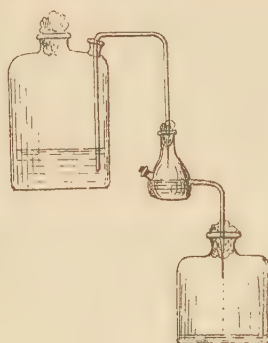
Fig. 3.



Fig. 4.

Fig. 5.

*Appareil
destiné au renouvellement continu
du bouillon de culture.*



TABLE

AVANT-PROPOS.	5
INTRODUCTION	7

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER. — <i>Bouillon riche en matériaux nutritifs</i>	13
Considérations générales.	13
Influence de la richesse du bouillon	15
Influence de l'abondance et de la hauteur du bouillon.	17
Influence du renouvellement du bouillon.	21
CHAPITRE II. — <i>Bouillon pauvre en matériaux nutritifs</i>	26
Caractères ordinaires des cultures en bouillon pauvre.	26
Influence de la nature et de la qualité de la semence sur les cultures en bouillon pauvre	30
Influence particulière du bouillon pauvre sur le mycélium	31
Influence de la pauvreté croissante du milieu nutritif.	35
Influence de la répétition des générations.	36

Nature des phénomènes observés dans la culture en	
bouillon pauvre	39
Que devient la vitalité dans les cultures en bouillon	
pauvre ?	40
Résistance à la chaleur	41
Résistance au vieillissement	45

DEUXIÈME PARTIE

<i>Influence des précédentes conditions de viticulture sur la</i>	
<i>virulence</i>	46
Richesse et abondance du bouillon.	47
Renouvellement du bouillon.	49
Pauvreté du bouillon	49
CONCLUSIONS	53

